

25/6

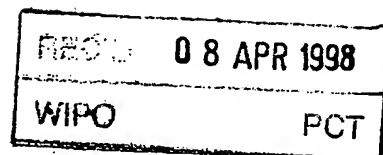
29

09/331262



PCT/BR 97/00081

4



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, DO COMÉRCIO E DO TURISMO

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CÓPIA OFICIAL

PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

PRIORITY DOCUMENT

O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de PRIVILÉGIO DE INVENÇÃO
regularmente depositado no Instituto Na-
cional da Propriedade Industrial, sob o
número PI 9606273-8 de 18/12/96

Rio de Janeiro, em 12 de Fevereiro de 1998.

Assinatura manuscrita de Carlos Pazos Rodrigues.
Carlos Pazos Rodrigues

Diretor Substituto de Patentes

INPI

10 DEZ 1980 001494

P19606273-8

DEP0511

MODELO I

AO INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

01. DEPOSITANTE: (71) Paulo Cesar Peregrino Ferreira (1) 091.689.406-10
 Erna Geessien Kroon (2) 920.320.679-15
 Jenner Karlisson Pimenta dos Reis (3) 570.316.226-20
 Isabella Bias Fortes Ferraz (4) 512.336.816-72
 Rômulo Cerqueira Leite (5) CGC/CPF: 076.498.001-72

02. ENDEREÇO: (1) Al. dos Jacarandás, 23/201. B. São Luiz, 31.275.060-Belo Horizonte, MG.
 (2) Av. Xangri-Lá, 75. B. Braúnas. 31.365.640-Belo Horizonte, MG. (3) Rua Nair Pentágua
 Guimarães, 165/101. B. Heliópolis. 31.760.100-Belo Horizonte, MG. (4) R. Athos Moreira Sil-
 va, 50. B. Belvedere. 30.320.480-Belo Horizonte, MG. (5) Rua Tenerife, 245, B. Copacabana -
 Belo Horizonte, MG. 31.550.220 - Todos: Brasil

03. REQUER PRIVILÉGIO DE:

PI X

MU

MI

DI

04. PRIORIDADE UNIONISTA:

PAÍS DE ORIGEM (33)

Nº DO DEPÓSITO (31)

DATA DO DEPÓSITO (32)

05. GARANTIA DE PRIORIDADE: DEPÓSITO NÚMERO: DATA:

06. TÍTULO: (54) Processo para o teste imunoenzimático com proteína P26 re-
 combinante do capsídeo viral no diagnóstico da anemia infecciosa equi-
 na. -----

07. INVENTOR(ES) E ENDEREÇO(S): (72) Paulo Cesar Peregrino Ferreira - Alameda dos Jacaran-
 dás, 23/201. B. São Luiz, Belo Horizonte, MG. Erna Geessien Kroon - Av. Xangri-Lá, 75. B.
 Braúnas. Belo Horizonte, MG. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis - Rua Nair Pentágua
 Guimarães, 165/101. B. Heliópolis. Belo Horizonte, MG. Isabella Bias Fortes Ferraz - R. A-
 thos Moreira Silva, 50. B. Belvedere. Belo Horizonte, MG. Rômulo Cerqueira Leite. Rua
 Tenerife, 245. Copacabana. Belo Horizonte, MG. Todos: Brasil

08. PROCURADOR E ENDEREÇO: (74)

CGC/CPF:

09. DOCUMENTOS ANEXADOS:

☒ GUIA DE RECOLHIMENTO☐ PROCURAÇÃO☐ AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR
OU DOCUMENTO DE CESSÃO☐ PROVA DE DEPÓSITO NO
PAÍS DE ORIGEM☐ DOCUMENTO DE CONTRATO
DE TRABALHO☒ RELATÓRIO DESCRITIVO 25 FLS.☒ REIVINDICAÇÕES 03 FLS.☒ DESENHO(S) 01 FLS.☒ RESUMO 01 FLS.

10. DECLARO, SOB PENAS DA LEI, QUE TODAS AS INFORMAÇÕES ACIMA PRESTADAS SÃO VERDADEIRAS:

Paulo Cesar Peregrino Ferreira
 Prof. Titular UFMG
 Isabella Bias Fortes Ferraz
 Veterinária

Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
 Professor Assist. - UFMG

Erna Geessien Kroon
 Prof. Adjunto - UFMG

Rômulo Cerqueira Leite
 Prof. Adjunto - UFMG

LOCAL E DATA

ASSINATURA AUTORIZADA

ATEN: as informações e instruções no verso.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção "PROCESSO PARA O TESTE IMUNOENZIMÁTICO COM PROTEÍNA P26 RECOMBINANTE DO CAPSÍDIO VIRAL NO DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA"

A presente invenção refere-se ao campo geral de produção de
5 testes imunodiagnósticos para detecção de anticorpos contra agentes
infecciosos.

A anemia infecciosa equina (AIE) é uma das doenças mais antigas causadas por vírus, tendo sido descrita pela primeira vez na França por LIGNEE, **Rec. Med. Vet.**, 20:30, 1843, e reconhecida como doença viral por VALLEE and CARRE. **Acad. Sci.**, 139:331-333, 1904. Ela afeta exclusivamente os membros da família **Equidae** apresentando uma distribuição mundial e grande importância econômica.

No Brasil a AIE foi descrita pela primeira vez por DUPONT et al. In: Congresso Brasileiro de Veterinária & Congresso Fluminense de Medicina veterinária. **Anais** p.160-161, 1968; por SILVA et al. In: Congresso Brasileiro de Veterinária & Congresso Fluminense de Medicina Veterinária, **Anais** p.173-82, 1968 e por GUERREIRO et al. **Bol. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor** 1/2: 3-4, 1968 nos estados da Guanabara, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Atualmente a prevalência da doença é bastante alta no centro oeste, estima-se que mais de 50% dos animais estejam infectados, principalmente no Pantanal Matogrossense, Roraima, norte de Minas Gerais e sul da Bahia. Dados não oficiais, têm mostrado um aumento da incidência da doença em outras regiões, mostrando desta forma que a doença está em expansão no território brasileiro.

O vírus da AIE (V-AIE) é classificado como um lentivirus
25 pertencente a família **Retroviridae** (CHARMAN et al. **J. Virol.** 19(2):1073-

Além de identidade morfológica, ambos os vírus possuem homologia em
sequências de nucleotídeos que codificam proteínas estruturais, suas células
primárias alvo são monócitos/macrófagos. Estes vírus apresentam variantes
genéticos/antigênicos durante infecções persistentes, o que está associado ao
mecanismo de escape ao sistema imunológico MONTAGNIER et al. *Ann.*
Virol., 135:119-134, 1984, MONTELARO et al. *J. Biol. Chem.*, 259:10539-
10544, 1984, RUSHLOW et al. *Virology*, 155:309-321, 1986, STREICHER et
al. *J. Am. Med. Assoc.* 256:2390-2391, 1986, STOLER et al. *J. Am. Med.*
Assoc. 256:2360-2364, 1986 e HAHN et al. *Science*, 232:1548-1553, 1986.

A transmissão da AIE ocorre principalmente por artrópodes (tabanídeos) que sugam sangue de animais que apresentam a forma aguda da doença (transmissão mecânica) justificando a alta prevalência da AIE em áreas pantanosas e quentes propícias ao ciclo de vida destes vetores ISSEL et al. **Vet. Microbiol.** 17:251-286, 1988. A AIE também pode ser transmitida pela placenta e colostro de éguas com altos títulos de vírus, e por agulhas e instrumentos cirúrgicos contaminados com sangue COGGINS **Comparative diagnosis of viral diseases**, NY, 4:646-658, 1981.

A AIE pode apresentar-se nas formas aguda, subaguda, crônica e principalmente inaparente ou assintomática ISSEL & COGGINS, **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 174(7):727-33, 1979, sendo que os sinais mais proeminentes são episódios febris recorrentes, anemia hemolítica, anorexia, rápida perda de peso e edema ventral.

Considerando a alta prevalência de portadores assintomáticos, o diagnóstico clínico não conclusivo e a possibilidade de confundir com outras doenças como as tripanosomíases, piroplasmose, leptospirose, hepatites e endoparasitoses o diagnóstico laboratorial assume papel decisivo no controle e prevenção da AIE.

A técnica para o diagnóstico mais utilizada em todos os países, inclusive no Brasil como teste oficial, é a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), uma prova de precipitação OUCHTERLONY, **Imunochemistry**, 3º ed.:106-7 1968, adaptada por COGGINS & NORCROSS **Cornell. Vet.** 60(2):330-5, 1970, utilizando antígeno produzido a partir de baço de cavalos infectados e NAKAJIMA & USHIMI **Infect. Immun.** 3(3):373-7, 1971, utilizando antígeno preparado em cultura de leucócitos de cavalo.

Dentre os testes imunoenzimáticos, a técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) tem sido muito utilizada para detectar e quantificar anticorpos contra varios agentes biológicos como vírus, bactérias e parasitas SCHUURS et al. **Clin. Chim.Acta.**, 81:1-40, 1977, TODD et al. **Vet. Rec.** 107:124-126, 1980. Esta técnica apresenta a vantagem de ser simples, rápida, específica e sensível. Varios laboratórios tem desenvolvido reações de ELISA baseadas na extração de proteínas (antígenos) do capsídio de virions cultivados em células de linhagem contínua MIA et al. **Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.**, 25:159-166, 1982, SHANE et al. **J. Clin. Microbiol.**, 19, 351-355, 1984, SHEN et al. **Am. J. Vet. Res.**, 45:1542-1543, 1984, SUGIURA et al. **Bull. Equine Res. Inst.**, 23:42-48, 1986 e SUZUKI et al. **Vet. Microbiol.**, 7:307-315, 1982. Estas preparações antigênicas são parcialmente purificadas e contém outras proteínas virais, bem como proteínas celulares e do soro fetal bovino utilizado no meio de cultura. O principal componente destas preparações é portanto uma proteína do capsídio viral cujo peso molecular é 26 KDa, (denominada p26). Esta é a proteína mais abundante da partícula viral PAREKH et al. **Virology**, 107:520-525, 1980, GELDERBLON, **AIDS** 5:617-638, 1991, é altamente conservada dentre as amostras variantes dos vírus isolados HUSSAIN et al. **J.Virol.** 61:2956-2961, 1987, SALINOVICH et al. **J. Virol.** 57:71-80, 1986. e é alvo da resposta imune (cavalos infectados apresentam anticorpos específicos anti-p26). Outra técnica bastante utilizada na identificação de anticorpos específicos é a de "Western blot". Nesta técnica os antígenos são fracionados em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidos eletroforeticamente para um papel de nitrocelulose onde se ligam irreversivelmente. No papel são feitas reações com soros a serem

testados e sequencialmente com conjugados (anticorpos ligados a enzimas). A reação é revelada através da adição de substratos cromógenos com formação de bandas coradas. ROSSMANITH & HORVATH et al. *J. Vet. Med. B.*, 36:49-56, 1989. Uma variação desta técnica denominada "Dot-blot" também pode ser usada. Neste caso os antígenos não fracionados são adsorvidos passivamente no papel de nitrocelulose onde a reação é revelada da mesma forma descrita anteriormente para o "Western-blot".

O uso de proteína de capsídio (p26) recombinante em testes imunodiagnósticos, permite um resultado mais confiável, já que não estão presentes nesta preparação antigênica, as proteínas contaminantes provenientes de antígenos oriundos da multiplicação do vírus em cultivos celulares e que são fontes de reações inespecíficas.

A metodologia usada para o teste imunoenzimático que utiliza proteína p26 recombinante correspondente ao capsídio viral, consiste em adsorver o antígeno recombinante em suportes sólidos (placas de microtécnica, tubos, beads ou papéis de nitrocelulose ou nylon) e proceder a análise dos soros (presença de anticorpos) de animais suspeitos de infecção pelo vírus da anemia infecciosa equina. O processo poderá ser melhor compreendido através da seguinte descrição detalhada em consonância com a figura em anexo onde a adsorção do antígeno (proteína p26 recombinante) ao suporte sólido (1), é feita pela sua diluição em tampão carbonato (Na_2CO_3 0,1-0,5 M; NaHCO_3 0,1-0,5 M, pH 8,0-9,6), adicionado nas concentrações de 0,01-1 μg e incubado a temperatura de 4-8°C por 18-24 h em placas de microtécnica, tubos ou beads; eletrotransferido ou transferido passivamente nas mesmas concentrações para papéis de nitrocelulose ou nylon. Após a adsorção do antígeno, o suporte foi lavado de 3 a 6 vezes com solução tampão (NaH_2PO_4 0,01-0,02 M, Na_2HPO_4 0,01-0,02 M, KCl 0,02-0,04 M, NaCl 0,8-0,9% pH 7,0-7,5), acrescida de tween 20 a 0,05-0,1% (Tampão-Tween). Em seguida para o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação (2) o suporte usado foi incubado com solução de bloqueio (leite em pó desnatado 1-5%, albumina bovina 1-5% ou caseína 1-5% em tampão-Tween) por 30-60 min em temperatura de 23°C-37°C. Após nova lavagem do suporte com tampão-

Tween, como descrito anteriormente, prosseguiu-se a etapa de reação com soros controles (positivo e negativo) e soros testes, onde os anticorpos presentes nos soros positivos se ligam ao antígeno da fase sólida (3). Os soros controle positivo, negativo e soros testes foram diluídos em tampão-tween e incubados a temperatura de 23°C-37°C. Após nova lavagem do suporte com tampão-tween foi feita a reação com conjugado, onde a anti-imunoglobulina equina se liga aos anticorpos que estão ligados aos antígenos (4). O conjugado pode ser uma anti-imunoglobulina equina conjugado a enzima peroxidase ou qualquer outra enzima como acetilcolinesterase, lactato desidrogenase, β -galactosidase, glicose oxidase, fosfatase alcalina, e outras. Este conjugado foi diluído em tampão-Tween de acordo com seu título e adicionado ao suporte com incubação a 23°C-37°C por 30-60 min. Foi feita nova lavagem do suporte com tampão-Tween e seguiu-se a revelação da reação (5) onde a enzima do conjugado transforma o substrato de incolor para um produto corado. A solução reveladora é composta do substrato da enzima utilizada no conjugado que no caso da peroxidase, por exemplo, é o ortofenilenodiamino diluído em tampão fosfato ou citrato 0,1-0,2 M, pH 5,0-8,0. Após o desenvolvimento de cor, que é proporcional a concentração de anticorpos específicos em cada amostra, foi acrescentado solução de ácido fixo (ácido sulfúrico) para paralização da reação (6), onde o ácido interrompe a reação anterior. Para o resultado final foi feita a leitura (7) da intensidade de cor formada em cada reação (amostra). Esta leitura foi feita visualmente (a olho nú) ou em espectrofotômetro, em absorbância, com um filtro específico para cor formada pela solução reveladora.

29.05.70

8- "PROCESSO PARA O TESTE IMUNOENZIMÁTICO COM
PROTEÍNA P26 RECOMBINANTE DO CAPSÍDIO VIRAL NO DIAGNÓSTICO
DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA" de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado pelo fato de que a paralização da reação, onde o ácido
interrompe a reação anterior (6) é feita com solução de ácido sulfúrico ou
5 qualquer outra solução ácida ou básica que paralize a reação.

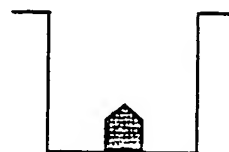
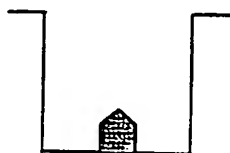
9- "PROCESSO PARA O TESTE IMUNOENZIMÁTICO COM
PROTEÍNA P26 RECOMBINANTE DO CAPSÍDIO VIRAL NO DIAGNÓSTICO
DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA" de acordo com a reivindicação 1,
10 caracterizado pelo fato de que a leitura da intensidade de cor formada em
cada reação (7) é feita a olho nú, em espectrofotômetro ou em qualquer
instrumento capaz de medir a intensidade da cor formada.

Figura

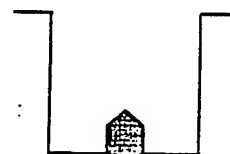
+

-

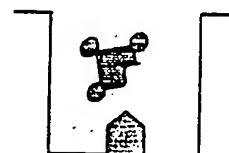
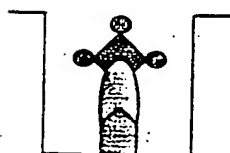
(1)



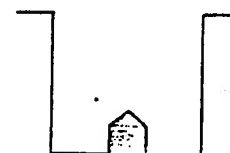
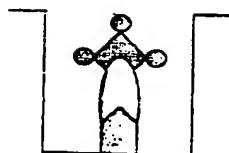
(2)



(3)



(4)



(5)

(6) (7)

BRASIL

RESUMO

Patente de Invenção "PROCESSO PARA O TESTE IMUNOENZIMÁTICO COM PROTEÍNA P26 RECOMBINANTE DO CAPSÍDIO VIRAL NO DIAGNÓSTICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA"

5 A presente invenção diz respeito ao teste imunoenzimático com antígeno viral p26 recombinante para ser usado no diagnóstico da anemia infecciosa equina. O teste denominado indireto, detecta anticorpos anti-proteína p26 do vírus da anemia infecciosa equina em soros de animais infectados. O antígeno foi adsorvido em suportes sólidos (placas de
10 microtécnica, tubos, beads ou papeis de nitrocelulose ou nylon) e colocado a reagir (incubado) com os soros testes. Após incubação com conjugado (Anti-imunoglobulina equina-enzima) a reação foi revelada com solução composta do substrato da enzima usada no conjugado (cromógeno). Após desenvolvimento da reação (formação de cor) a mesma foi paralizada com
15 solução ácida e lida visualmente (a olho nú) ou em espectrofotômetro com um filtro específico para a cor formada.